

学校编码: 10384 分类号__密级__
学号: 200215001 UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

硫化氢和次氯酸分子探针的合成与细胞成像

Reaction based probes for detection of hydrogen sulfide
or hypochlorous acid in live cells

吴志生

指导教师姓名: 韩守法教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

**Reaction based probes for detection of hydrogen sulfide
or hypochlorous acid in live cells**

A Dissertation Submitted for the Degree of
Master of Science

By

Zhi-Sheng Wu

Supervisor: Prof. Shoufa Han

Department of Chemistry, Xiamen University

June 2013

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

硫化氢(H_2S)和次氯酸(HOCl)是两种重要的氧化还原型物种, 它们跟生物体的新陈代谢以及疾病有着重大的关联。为探究它们的生物学功能, 我们需要研究它们在生物体内的存在与含量变化。为此, 设计合成具有高灵敏度、高选择性的硫化氢与次氯酸荧光探针, 具有重要的生物学意义。本论文在前人工作的基础上, 根据一些特异性化学反应, 设计合成了若干分子探针用于识别硫化氢和次氯酸。论文分六章, 分别包括以下内容:

第一章 首先简要介绍了荧光传感器的基本概念以及设计原理。其次介绍了硫化氢及次氯酸分子的细胞生物学。综述了近些年关于硫化氢与次氯酸分子识别探针的相关报道。简要介绍了香豆素染料和罗丹明染料的光学性质及应用研究。

第二章 基于硫化氢可还原叠氮基为氨基的化学原理, 我们设计合成了带叠氮基团的香豆素。该叠氮香豆素不发射荧光, 当它与硫化氢作用后, 叠氮基还原为氨基再发生分子内酯交换反应游离出羟基香豆素从而发射强烈的荧光。探针具有高选择性识别硫化氢, 几乎不受其它活性物质的干扰, 我们验证了探针的检测机理, 并实现了在细胞水平上对硫化氢成像。

第三章 基于硫化氢可与Michael受体发生共轭加成反应的化学原理, 我们设想合成带有Michael受体的荧光素衍生物。按照设想的荧光素合成方法, 我们并未合成出所要的目标化合物, 却意外得到一个新的荧光化合物。我们通过核磁共振, 高分辨质谱等表征手段, 甚至通过化学理论计算模拟得知该荧光化合物是种香豆素染料。该染料分子具有高达0.68的量子产率, 斯托克位移为150 nm, 荧光强度不受pH和阳离子干扰, 具有潜在的生物应用价值。

第四章 研究了次氯酸的氧化性, 能够将C-N键氧化为C=N双键。我们设计合成了一系列苯并噻唑衍生物, 并筛选出与次氯酸具有较强荧光响应探针分子**SA-thiazoline**。当探针与次氯酸作用后, 单键被氧化为双键产生更大的共轭结构而使分子发光。其检测的灵敏度与选择性较高并将可应用到生物体系里, 实现了其在L929细胞里次氯酸的成像分析。

第五章, 设计了一种六元内环的罗丹明探针, 利用了罗丹明“关-开”工作原理, 基于次氯酸的脱脞反应, 该探针能与次氯酸快速做出响应, 通过目视比色

法以及荧光分析法可以对其进行高灵敏检测，并可以在细胞水平上对次氯酸成像。

第六章，将研究生阶段工作中一些失败的例子加以总结分析，希望能对后来者有所启发与帮助。

关键词：硫化氢；次氯酸；分子探针

Abstract

Hydrogen sulfide (H_2S) and hypochlorous acid (HOCl) are two oxido-reductively reactive species related to multiple diseases. Optical probes that could selectively report the levels of their levels within cells would be valuable to discern their biological functions. As such, significant efforts have been devoted to imaging agents for sensitive and selective detection of H_2S and HOCl . In this dissertation, I developed a number of reaction-based chemodosimeters for fluorescent detection of H_2S and HOCl . This dissertation consists of six chapters summarized as follows:

In chapter 1, a general introduction to the concept and basic building mode of molecular sensors was presented. Emphasis was focused on the development of optical molecular sensors for H_2S and HOCl . Brief introduction to coumarin and rhodamine derivative's optical properties and application were presented.

In chapter 2, a coumarin derivative was developed and synthesized on the basis of reduction of azide to amine. Upon reaction with H_2S , the azido was reduced to amino followed by cleavage ester bond to form high-fluorescent coumarin. The reaction mechanism is verified and it can be detected in HeLa cells.

In chapter 3, in an effort to prepare new fluorescein derivatives for detection of H_2S , a new fluorescent compound was unexpectedly obtained. NMR, HRMS spectra and theoretical calculation were utilized to elucidate the molecular identity. The fluorescence properties of the new compound were performed. Quantum yield was measured about 0.68 and it showed a large stokes shift of 150 nm which make it potential application in biological systems.

In chapter 4, oxidation of hypochlorous acid that it can transform carbon-nitrogen single bond to double bond is investigated. A series of benzothiazole derivative were synthesized and **SA-thiazoline** was employed for detection of HOCl in L929 cells.

In chapter 5, rhodamine derivative bearing a six-membered ring was developed. The sensor can response quickly to HOCl via deoximation reaction, and was used for chromo-fluorogenic detection of the analyte.

In chapter 6, the studies on other optical molecular chemodosimeters were summarized.

Keywords: Hydrogen sulfide; Hypochlorous acid; Chemodosimeters

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要	I
Abstract	III
目 录	V
Table of contents	VIII
第一章 绪论	1
第一节 荧光传感器概述	1
1.1.1 荧光的产生	1
1.1.2 分子识别与分子传感器	2
1.1.3 荧光传感器设计的基本原理	3
第二节 硫化氢(H_2S)分子传感器的研究现状	5
1.2.1 硫化氢(H_2S)分子的细胞生物学	5
1.2.2 用于检测硫化氢(H_2S)的分子探针	7
第三节 次氯酸(HOCl)分子传感器的研究现状	12
1.3.1 次氯酸(HOCl)分子的细胞生物学	12
1.3.2 用于检测次氯酸(HOCl)和次氯酸根(ClO^-)分子探针	14
第四节 香豆素类化合物概述	18
第五节 罗丹明类化合物概述	20
第六节 论文选题的意义与目标	21
第二章 基于叠氮还原的硫化氢探针	23
第一节 探针的设计思路	23
第二节 探针分子的合成与表征	23
2.2.1 仪器	23
2.2.2 试剂	24
2.2.3 叠氮香豆素的合成与表征	24
2.2.4 4-甲基-7-乙酰氧基香豆素的合成与表征	25
第三节 实验结果和讨论	25
2.3.1 实验方法	25
2.3.2 反应介质的优化	25
2.3.3 探针的灵敏度分析及工作曲线的绘制	26
2.3.4 动力学曲线	27
2.3.5 探针的选择性分析	28
2.3.6 机理的探讨与验证	29
2.3.7 探针的细胞成像	32

第四节 本章小结	32
第三章 基于 Michael 受体的硫化氢探针	34
第一节 探针的设计思路	34
第二节 实验结果和讨论	34
3.2.1 仪器	34
3.2.2 试剂	34
3.2.3 合成方法与产物表征	35
3.2.4 产物结构和反应机理推断	36
3.2.5 计算模拟	36
3.2.6 染料分子的荧光光谱	37
3.2.7 染料分子的酸碱敏感性	38
3.2.8 染料分子的荧光量子产率	38
3.2.9 金属离子的荧光响应	39
3.2.10 染料分子的细胞成像初探	40
3.2.11 细胞毒性分析	40
第三节 本章小结	41
第四章 基于 C-N 单键氧化的次氯酸探针	42
第一节 探针的设计思路	42
第二节 探针分子的合成与表征	43
4.2.1 仪器	43
4.2.2 试剂	43
4.2.3 系列衍生物的合成与表征	43
第三节 实验结果与讨论	44
4.3.1 实验方法	44
4.3.2 探针分子的筛选	44
4.3.3 反应介质的优化	45
4.3.4 动力学曲线	45
4.3.5 探针的灵敏度分析及工作曲线的绘制	46
4.3.6 探针的选择性分析	46
4.3.7 机理的探讨与验证	48
4.3.8 探针的细胞成像	50
第四节 本章小结	51
第五章 基于罗丹明六元内环“关-开”原理的次氯酸探针	52
第一节 探针的设计思路	52
第二节 探针分子的合成与表征	52
5.2.1 仪器	52
5.2.2 试剂	52
5.2.3 罗丹明六元内环衍生物的合成与表征	53
第三节 实验结果和讨论	54
5.3.1 实验方法	54
5.3.2 反应介质的优化	54

5.3.3 对照实验	55
5.3.4 动力学曲线	55
5.3.5 探针的灵敏度分析	56
5.3.6 探针的选择性分析	57
5.3.7 机理的探讨与验证	58
5.3.8 探针的细胞成像	59
第四节 本章小结	59
第六章 其它体系的探讨	60
第一节 探针分子的设计思路	60
第二节 实验结果和讨论	62
6.2.1 仪器	62
6.2.2 试剂	62
6.2.3 讨论分析	62
附录 相关化合物的表征图谱	65
参考文献	78
硕士期间发表和交流的学术论文	89
致谢	90

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Contents	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Brief introduction to optical molecular sensors	1
1.1.1 Molecular recognition and molecular sensing	3
1.1.2 Basic principles of designing optical molecular sensors	3
1.2 Research progress on optical probes for H₂S	5
1.2.1 Cell biology of H ₂ S and its research significance	5
1.2.2 Fluorescent probes for detection of H ₂ S.....	7
1.3 Research progress on optical probes for HOCl	12
1.2.1 Cell biology of HOCl	12
1.2.2 Fluorescent probes for detection of HOCl.....	14
1.4 Introduction of coumarin derivatives	18
1.5 Introduction of rhodamin derivatives	20
1.6 The objective and significance of this dissertation	21
Chapter 2 H₂S probe based on reduction of azide	23
2.1 Basic idea about the design of the probe	23
2.2 Synthesis and characterization of the probe	23
2.2.1 Apparatus	23
2.2.2 Reagents	24
2.2.3 Synthesis and characterization of sensor	24
2.2.4 Synthesis and characterization of 7-acetoxy-4-methylcoumarin.....	25
2.3 Results and discussions	25
2.3.1 Experimental.....	25
2.3.2 Optimization of experimental conditions	25
2.3.3 Sensitivity of probe and calibration graphs	26
2.3.4 Kinetic curve.....	27
2.3.5 Selectivity of probe	28
2.3.6 Discussion of reaction mechanism.....	29
2.3.7 Cell imaging.....	32
2.4 Conclusion of chapter 2	32
Chapter 3 H₂S probe based on Michael acceptor	34

3.1 Basic idea about the design of the probe	34
3.2 Results and discussions	34
3.2.1 Apparatus	34
3.2.2 Reagents	34
3.2.3 Synthetic method and characterization of product.....	35
3.2.4 Structure and deduction of product	36
3.2.5 Calculation.....	36
3.2.6 Fluorescence spectrum of dye.....	37
3.2.7 Fluorescence response to pH	38
3.2.8 Quantum yields	38
3.2.9 Fluorescence response to metal ions	39
3.2.10 Study of cell imaging.....	39
3.2.11 Analysis of cell toxicity	40
3.3 Conclusion of chapter 3	41
Chapter 4 HOCl probe based on oxidation of C-N single bond	42
4.1 Basic idea about the design of the probe	42
4.2 Synthesis and characterization of the probe	43
4.2.1 Apparatus	43
4.2.2 Reagents	43
4.2.3 Synthesis of a series of benzothiazole derivatives.....	43
4.3 Results and discussions	44
4.3.1 Experimental.....	44
4.3.2 Screen of probe	44
4.3.3 Optimization of experimental conditions	45
4.3.4 Kinetic curve	45
4.3.5 Sensitivity of probe and calibration graphs	46
4.3.6 Selectivity of probe	47
4.3.7 Discussion of reaction mechanism.....	49
4.3.8 Cell imaging.....	50
4.4 Conclusion of chapter 5	51
Chapter 5 HOCl probe based on rhodamine “Off-On”	52
5.1 Basic idea about the design of the probe	52
5.2 Synthesis and characterization of the probe	52
5.2.1 Apparatus	52
5.2.2 Reagents	52
5.2.3 Synthesis and characterization of rhodamine derivatives	53
5.3 Results and discussions	54
5.3.1 Experimental.....	54
5.3.2 Optimization of experimental conditions	54
5.3.3 Control experiment.....	55
5.3.4 Kinetic curve.....	55
5.3.5 Sensitivity of probe and calibration graphs	56

5.3.6 Selectivity of probe	57
5.3.7 Discussion of reaction mechanism.....	58
5.3.8 Cell imaging.....	59
5.4 Conclusion of chapter 5	59
Chapter 6 Investigation of other sensing system.....	60
6.1 Basic idea about the design of the probe	60
6.2 Results and discussions	62
6.2.1 Apparatus	62
6.2.2 Reagents	62
6.2.3 Discussion.....	62
Appendix Characterization of related compound	65
References.....	78
Publications during author's studying for Master degree.....	89
Acknowledgements.....	90

第一章 绪论

动植物体内存在各种微量或衡量的生物活性物种（例如：小分子、活性自由基和阴阳离子等），它们通过参与各种生理过程来调节生物体新陈代谢等活动从而在机体中引发各种生物效应。硫化氢(H_2S)和次氯酸(HOCl)就是两种重要的生物活性物质。据报道，硫化氢是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的另一种信号分子，而次氯酸是生物体内重要的一种活性氧(ROS)。研究生物活性物质的存在状态、结构及其生理功能，探讨生物活性物质在疾病发生、发展、转归、控制和防治中所起的作用，将人类以生物调节为中心综合防治疾病奠定重要的基础。如果想要探究它们的生物学功能，阐明其在生命活动中所发挥的作用，就必须有一套准确、可靠的检测方法来实现对这些活性物种浓度、存在形式等方面的定性和定量检测。

荧光传感器是人们探测微观生命系统的有力武器，它与显微成像技术的结合，在生命信息的活体、原位和动态监测中具有突出的优势，成为分子传感器的首选信号输出形式。进入二十一世纪后，人们对生物活体组织的组成结构和衍化信息的需求达到一个更高的层次，设计能满足新的信息探测要求的新型高性能光学分子探针具有重要的科学研究意义。

第一节 荧光传感器概述

1.1.1 荧光的产生

荧光是一种光致发光的冷现象，当紫外光或可见光照射到某些物质上时，这些物质就会发射出波长和强度各不相同的光，停止光照射时，光线消失。它的产生原理可以用 Alexander Jablonski 提出的荧光产生过程图来解释，通常被称为 Jablonski 图。通常情况下，荧光试剂分子处于基态，在激发光作用下荧光分子的电子被激发而处于激发态，基态和激发态都有单重态和三重态两种类型。当分子内轨道中的所有电子自旋配对，自旋方向相反，此时分子处于单线态，用 S 表示。大多数有机物分子的基态都处于单线态。当分子吸收光能后，电子从基态跃迁到高能态，自旋方向不变，此时分子处于激发单重态。 S_0, S_1, S_2, \dots ，表示分子的基态和第一，第二，...激发单重态，能量由低到高。如果处于基态单重态的有

机物分子的电子在跃迁过程中伴随有电子自旋方向的变化,在激发态分子轨道中就有两个自旋不配对的电子,此时分子处于激发态的三重态,用 T 表示, T_1 , T_2 分别表示三重态的第一,第二激发态。分子中的电子从基态 S_0 跃迁到激发态 S_1 , S_2 比较容易发生,产生很快,而从基态单重态到激发态三重态不容易发生。高能态的单重态激发态分子(如 S_2)可以与其它同类分子或者溶剂分子碰撞通过内转换回到激发态的最低能级 S_1 ,这一过程为 $10^{-12}s$,处于激发态最低能级的分子寿命很短,一般为 $10^{-4} \sim 10^{-8}s$,他们会释放出光子返回基态,这个过程产生的光就是荧光。从 S_1 到 T_1 能量转化是系间跨越。从 T_1 回到 S_0 有两种过程,一种是无能量释放,另一种是放出光子,即磷光。

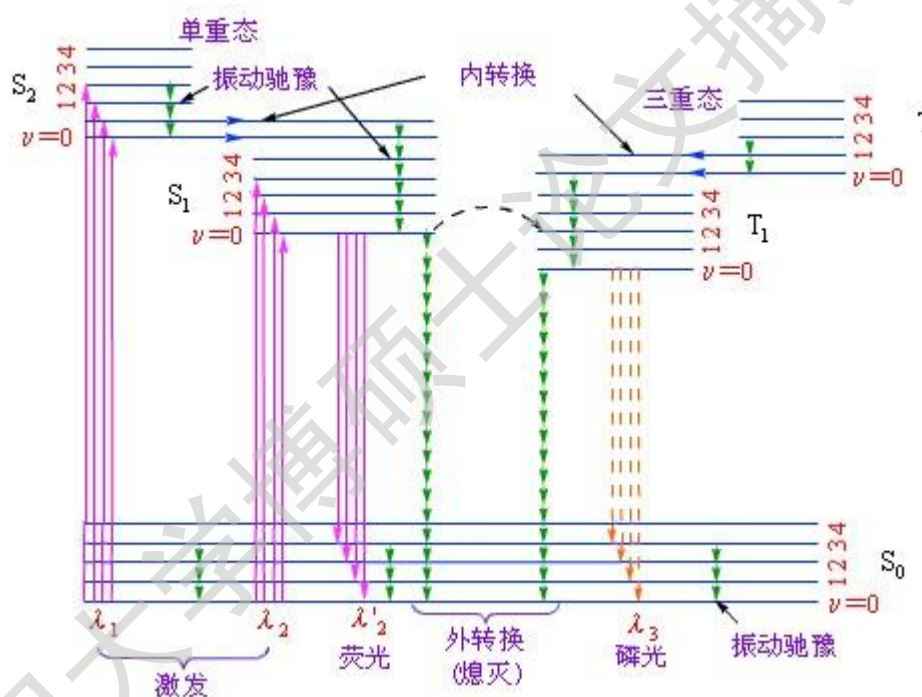


图 1.1 发光系统的 Jablonski 示意图

Fig. 1.1 Jablonski diagram for a photoluminescent system

1.1.2 分子识别与分子传感器

分子识别与分子传感器是超分子化学研究的重要内容之一,分子识别这一概念最初是被有机化学家和生物学家用来在分子水平上研究生物体系中的化学问题而提出,用来描述有效的并且有选择的生物功能。分子识别的过程实际上是分子在特定的条件下通过分子间作用力的协同作用达到相互结合的过程。它既满足相互作用的分子间的空间匹配要求,也满足分子间各种次级键力的匹配,可形象地描述为锁和钥匙间的相互关系。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库